

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2004年1月15日 (15.01.2004)

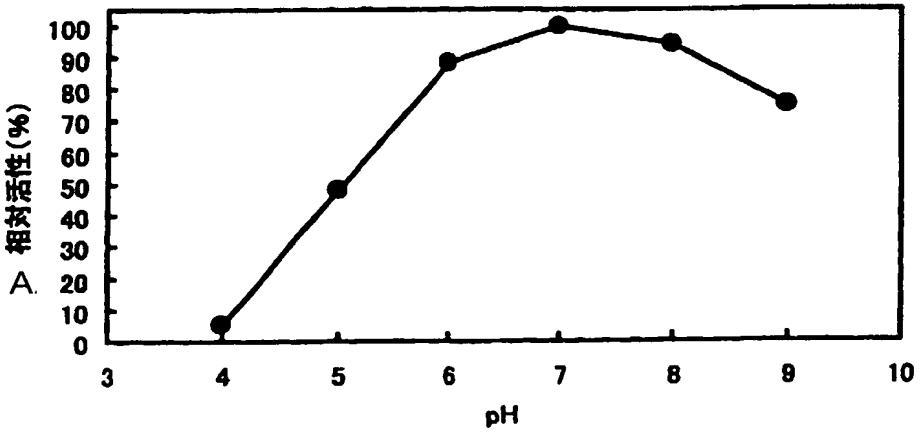
PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/005503 A1

(51) 国際特許分類<sup>7</sup>: C12N 9/52, A23C 19/032  
 (21) 国際出願番号: PCT/JP2003/008373  
 (22) 国際出願日: 2003年7月1日 (01.07.2003)  
 (25) 国際出願の言語: 日本語  
 (26) 国際公開の言語: 日本語  
 (30) 優先権データ:  
 特願2002-194016 2002年7月2日 (02.07.2002) JP  
 (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 株式会社まほろば (MAHOROBA CO., LTD.) [JP/JP]; 〒063-0035 北海道 札幌市西区西野5条2丁目9番16号 Hokkaido (JP).  
 (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 株式会社まほろば (MAHOROBA CO., LTD.) [JP/JP]; 〒063-0035 北海道 札幌市西区西野5条2丁目9番16号 Hokkaido (JP).  
 (72) 発明者: 八十川 大輔 (YASOKAWA,Daisuke) [JP/JP]; 〒069-0836 北海道 江別市文京台緑町 589-4 北海道立食品加工研究センター内 Hokkaido (JP).  
 (72) 発明者: および  
 (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 沢田 均 (SAWADA,Hitoshi) [JP/JP]; 〒060-0812 北海道 札幌市北区 北12条西6丁目 北海道大学薬学部内 Hokkaido (JP). 中川 良二 (NAKAGAWA,Ryoji) [JP/JP]; 〒069-0836 北海道 江別市文京台緑町 589-4 北海道立食品加工研究センター内 Hokkaido (JP). 川上 誠 (KAWAKAMI,Makoto) [JP/JP]; 〒069-0836 北海道 江別市文京台緑町 589-4 北海道立食品加工研究センター内 Hokkaido (JP). 長島 浩二 (NAGASHIMA,Koiji) [JP/JP]; 〒069-0836 北海道 江別市文京台緑町 589-4 北海道立食品加工研究センター内 Hokkaido (JP).  
 [統葉有]

(54) Title: MILK-COAGULATING ENZYME ORIGINATING IN BACTERIUM AND PROCESS FOR PRODUCING CHEESE USING THE SAME

(54) 発明の名称: 細菌由来凝乳酵素及び当該酵素を用いたチーズの製造



A...RELATIVE ACTIVITY (%)

WO 2004/005503 A1

(57) Abstract: It is intended to provide a milk-coagulating enzyme originating in a bacterium and a process for producing cheese by using this enzyme. Namely, an enzyme which is produced by a bacterium belonging to the genus *Paenibacillus* sp. and has an activity of coagulating milk, characterized by having the following enzymological properties: (1) function: having an activity of coagulating milk to form a curd; (2) substrate specificity: acting on  $\kappa$ -casein as a substrate and specifically cleaving Thr94-Met95 in the presence of calcium; (3) optimum pH: 6.0 to 7.0; and (4) molecular weight: 35,000 to 37,000 Da when measured by SDS-PAGE; a process for producing the enzyme; a process for producing cheese; and a cheese-like food product.

(57) 要約: 本発明は、細菌由来凝乳酵素及び当該酵素を用いたチーズの製造を提供するものであり、ペニバチルス属細菌 (*Paenibacillus* sp.) により生産される、凝乳活性を有する酵素であって、以下の酵素学的性質; (1) 作用: 乳を凝固させてカードを形成する凝乳作用を有する、(2) 基質特

[統葉有]



海道立食品加工研究センター内 Hokkaido (JP). 宮下周平 (MIYASHITA,Shuhei) [JP/JP]; 〒063-0035 北海道 札幌市西区西野5条2丁目9番16号 株式会社まほろば内 Hokkaido (JP). 宮下洋子 (MIYASHITA,Hiroko) [JP/JP]; 〒063-0035 北海道 札幌市西区西野5条2丁目9番16号 株式会社まほろば内 Hokkaido (JP).

(74) 代理人: 須藤 政彦 (SUDO,Masahiko); 〒103-0022 東京都 中央区日本橋室町1丁目6番1号 真洋ビル6階 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL,

TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CR, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:  
— 國際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

## 明細書

## 細菌由来凝乳酵素及び当該酵素を用いたチーズの製造

## 5 技術分野

本発明は、細菌由来凝乳酵素及び当該酵素を用いたチーズの製造方法に関するものであり、更に詳しくは、ペニバチルス属細菌が生産する凝乳酵素、及び当該酵素を用いたチーズ及びチーズ様食品の製造方法に関するものである。本発明は、細菌由来の新規凝乳酵素を用いて、良質な芳香、味、食感を特徴とする新しいタイプのチーズ及びチーズ様食品及びその製造方法を提供するものとして有用である。

## 背景技術

従来より、チーズを製造するに際しては、原料乳を凝固させるために凝乳酵素が必要とされ、離乳前の子牛第4胃から抽出、調製されるキモシンが凝乳酵素として伝統的に用いられている。しかし、このキモシンの原料となる子牛の慢性的な供給不足から、1970年代初め頃より、多くの研究者が精力的にキモシンに代わる凝乳酵素の研究、開発を行ってきた。

そして、これまでに、動物、植物及び微生物起源のキモシンに代わる多数の凝乳酵素が見いだされ、チーズ製造への利用の試みがなされている。しかし、キモシンに代わる凝乳酵素として実用化されているものは、動物起源のペプシンやエンドシア・パラシチカ (Endothia parasitica)、ムコール・プシルス (Mucor pusillus) 及びムコール・ミイヘイ (Mucor miehei) の糸状菌3種が产生する微生物起源の微生物レンネットのみである。

## 発明の開示

このような状況の中で、本発明者らは、良質な芳香、味、食感を特徴とする新しいタイプのチーズを開発するのに有用な新たな微生物起源の凝乳酵素を見いだすべく、鋭意検討を行ったところ、分離した細菌の培養上清が強い凝乳活性を有することを見いだし、更に研究を重ねて本発明を完成するに至った。

即ち、本発明は、ペニバチルス属細菌が產生する凝乳酵素を用いたチーズ及びチーズ様食品の製造方法を提供することを目的とするものである。

また、本発明は、上記食品の製造に使用する細菌由来の新規凝乳酵素を提供することを目的とするものである。

上記課題を解決するための本発明は、以下の技術的手段から構成される。

(1) ペニバチルス属細菌 (P a e n i b a c i l l u s s p.) により生産される、凝乳活性を有する酵素であって、以下の酵素学的性質；

(a) 作用：乳を凝固させてカードを形成する凝乳作用を有する、(b) 基質特異性： $\kappa$ カゼインを基質としてカルシウム存在下で Th 94 - Met 95 を特異的に切断する、(c) 至適 pH : 6.0 ~ 7.0、(d) 分子量 : SDS - PAGE により測定した分子量は 35,000 ~ 37,000 Da、

を有することを特徴とする凝乳酵素。

(2) 50 ~ 80 % 飽和の硫酸アンモニウム溶液で塩析される、前記(1)に記載の酵素。

(3) 50 ~ 80 % 飽和の硫酸アンモニウム溶液で塩析される、安定な

pH領域が6.0～8.0、安定な温度域が40～50℃であることを特徴とする前記(2)に記載の酵素。

(4) ペニバチルス属細菌が、受託番号F E R M P-18138である、前記(1)に記載の酵素。

5 (5) 乳を原料としてチーズを製造するに当たり、前記(1)から(4)のいずれかに記載の凝乳酵素を用いてカードを形成させ、ホエー分離後、熟成させることを特徴とするチーズの製造方法。

(6) 前記(5)に記載の方法により製造される、乳を原料として細菌由来凝乳酵素を用いて製造したことを特徴とするチーズ様食品。

10

次に、本発明について更に詳細に説明する。

本発明は、凝乳酵素の產生能を有する特定の細菌を培養し、得られる培養物から本発明の凝乳酵素を採取すること、また、本発明の凝乳酵素を用いて、チーズ及びチーズ様食品を製造し、提供すること、を特徴とするものである。本発明において、上記凝乳酵素を產生する菌株は、その生理学的性状及び16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列の比較から、Paenibacillus属に分類される。この菌株は、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに、受託番号F E R M P-18138、微生物の表示Paeni、として寄託されている。

20 このペニバチルス属細菌の培養物から凝乳酵素を取得する方法としては、例えば、上記菌株を用いて、固体培養を行った場合、培養物と等量の水あるいは緩衝液を加えて抽出処理し、凝乳酵素の粗酵素液を得、適宜、その粗酵素液を濃縮、乾燥して凝乳酵素の粗酵素粉末を得る方法を用いることができる。また、上記菌株を用いて、液体培養を行った場合25、遠心分離を行って菌体を除去し、その培養上清に硫酸アンモニウムなどを加えるか、あるいはアセトンやアルコールなどの有機溶媒を加

えて、凝乳酵素を沈殿させ、その沈殿を分離、回収し、乾燥して凝乳酵素の粗酵素粉末を得ることができる。しかし、本発明は、これらの方  
に制限されるものではなく、適宜の方法を用いることができる。

次に、本発明の凝乳酵素の精製方法としては、通常行われる酵素の精  
5 製方法を用いることができる。好適には、例えば、ペニバチルス属細菌  
の液体培養の培養上清から得られた粗酵素液を、疎水カラムクロマトグ  
ラフィー及び陽イオン交換カラムクロマトグラフィーで精製する方法を  
用いることができるが、これらに制限されるものではない。本発明で用  
いるペニバチルス属細菌の培養方法については、固体培養では、例えば  
10 、スキムミルクを 1 w/v % となるように加えた標準寒天培地 (0.2  
5 % 酵母エキス、 0.5 % ペプトン、 0.1 % グルコース、 1.5 % 寒  
天) を用い、 35 °C で一晩培養後、室温で培養する方法が例示され、ま  
た、液体培養では、例えば、 0.5 % コーンスティーピリカーチ、 0.5  
% 可溶性デンプン、 0.5 % NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7.0) を基本組成  
15 とした液体培地 (基本液体培地) を様々に改変したものを用い、 37 °C  
で 180 rpm の回転振盪培養する方法が例示されるが、これらに制限  
されるものではなく、適宜の方法を利用することができる。

本発明の凝乳酵素は、培養物から粗酵素液を抽出し、この粗酵素液を  
、好適には、 50 ~ 80 % 飽和の硫酸アンモニウム溶液で硫安塩析した  
20 後、陽イオン交換クロマトグラフィー及び疎水クロマトグラフィーで精  
製して精製酵素標品を得ることができる。

即ち、凝乳酵素の分画・精製方法については、例えば、基本液体培地  
で上記菌株を 8 時間培養後、集菌し、 0.5 % デンプン - 5 mM Ca  
Cl<sub>2</sub> に再懸濁して一晩培養し、遠心にて菌体等を除いた後、上清に 5  
25 0 % 飽和となるように硫安を溶解し、超遠心にてデンプンを含む多糖類  
を除去し、得られた上清に 80 % 飽和となるように硫安を追加、溶解し

、4℃で一晩放置し、沈澱を遠心にて回収し、3. 3 mM MES／3. 3 mM M E P E S／3. 3 mM 酢酸Na－5 mM CaCl<sub>2</sub> (pH 5. 5) の緩衝液に溶解後、ポアサイズ0. 8 μmのフィターを通して、同一緩衝液に対して一晩透析し、得られた酵素標品を、陽イオン交換カラムクロマトグラフィーに供し、活性画分を分取し、これに硫安濃度を最終濃度1 Mとなるように硫安を添加して、疎水クロマトグラフィーを行い活性画分を分取する方法が例示される。上記方法により得られた活性画分は、10% SDS-PAGEで、ほぼ一本の単一バンドとして検出される。本発明においては、凝乳酵素の分画、精製方法は、上記方法に制限されるものではなく、上記方法に準じて、適宜の方法及び条件を設定することができる。

次に、本発明の凝乳酵素の酵素学的性質を示す。

#### (1) 至適作用pH及び安定pH

本発明の凝乳酵素の至適pH及びpH安定性を調べた。至適pHについては、100 mMの所定pHに調整した緩衝液に、10% W/v スキムミルク－10 mM CaCl<sub>2</sub>となるように、スキムミルク及び塩化カルシウムを加えたものを用いて測定した。また、pH安定性については、50 mMの所定pHに調整した緩衝液中で10分間35℃に保ち、残存活性を比較した。その結果、凝乳活性はpH 6. 0～7. 0に極大値を持ち、pH 8. 0ではpH 7. 0での活性の64%程度であった。また、凝乳活性はpH 6. 0～8. 0でほぼ安定であったが、pH 4. 0ではほぼ失活した。

#### (2) 至適作用温度及び熱安定性

次に、本発明の凝乳酵素の至適作用温度及び熱安定性を調べた。至適作用温度については、所定温度での凝乳活性を測定した。また、熱安定性については、20 mM MES／HEPES／酢酸ナトリウム－5 m

M C a C l<sub>2</sub> 中で 10 分間所定温度に保ち、残存活性を比較した。その結果、この酵素は 40 ~ 50 ℃まで安定で、凝乳活性は温度が高くなるにつれて増大したが、50 ℃付近で失活が始まり、70 ℃で殆ど失活した。

5 (3) 阻害剤

本発明の凝乳酵素の凝乳活性を阻害剤を用いて調べた。E D T A で凝乳活性は阻害され、C a イオンが活性の維持及び発現に必須であった。

(4) 分子量

S D S - P A G E により測定した本発明の凝乳酵素の分子量は約 35 10 、 000 ~ 37,000 D a である。

(5) 活性測定法

本発明の凝乳酵素の凝乳活性は A r i m a らの方法に準じて測定した。即ち、0.01 M 塩化カルシウムに溶解した 10 % 還元脱脂乳を基質として用い、この基質 5 m l に対して 5 ~ 10 分間でカードフラグメントが生成するように濃度調整した酵素液 0.5 m l を加え、35 ℃に保持した。時々攪拌し、カードフラグメントの生成を観察した。カードフラグメントが生成するまでの時間を測定し、1 分間に凝乳を開始する酵素量を 400 ユニットとした。

(6) 作用

20 本発明の酵素は、乳を凝固させてカードを形成する凝乳作用を有する。

(7) 基質特異性：  $\kappa$  カゼインを 10 m g / m l の濃度で 20 mM M O S O (p H 6.5) - 10 mM C a C l<sub>2</sub> に溶解し、凝乳溶液を 1 / 20 容で加えて、37 ℃で 15 分間インキュベートし、その消化産物を T r i s / T r i c i n e 系 S D S - P A G E により分離し、P V D F 膜に転写して N 末端アミノ酸配列分析を行った。アミノ酸配列分析に

については、凝乳酵素を0.1%TFAで溶解後、同溶液で平衡化したP  
h e n y l 5 P W R Pカラムに添加し、アセトニトリルの濃度勾配  
で溶出した。メインピークのN末端アミノ酸配列をプロテインシークエ  
ンサーを用いて分析した。その結果、 $\kappa$ カゼインを基質として、カルシ  
5 ウム存在下で、Thr 94-Met 95を特異的に切断する。

本発明では、乳を原料としてチーズを製造するに当たり、上記凝乳酵  
素を用いてカードを形成させ、ホエー分離後、熟成させることにより、  
チーズ及びチーズ様食品を製造することができる。本発明において、上  
10 記チーズ及びチーズ様食品を製造する具体的なプロセスは、上記凝乳酵  
素を使用する他は、通常のチーズの製造方法を適宜採用することが可能  
であり、例えば、生乳を、65°Cで加熱殺菌後、30°Cに急冷し、本発  
明の凝乳酵素と、乳酸菌スター及び塩化カルシウムを定法に従って  
添加し、そのまま保温後、形成されたカードをカットし、攪拌した後、  
15 カードをガーゼに取ってホエーを抜き、プレス後20%塩水浸漬し、乾  
燥後、真空包装し、15°Cの熟成庫に保存し、熟成する方法が例示され  
る。しかし、これらのプロセス及び条件は、上記方法に限定されるもの  
ではなく、その製品の種類に応じて任意に設定することができる。

本発明の方法により製造したチーズ及びチーズ様食品について、ピア  
20 ノ線でのせん断応力、食感、電子顕微鏡でのチーズ断面観察、遊離アミ  
ノ酸組成を調べて、通常のカーフ・レンネットを用いて同様の条件で製  
造したチーズ製品と比較した結果、せん断応力、うまみアミノ酸である  
グルタミン酸及び疎水性アミノ酸のイソロイシン含量の点で、本発明の  
チーズが、レンネットチーズを上回ったこと、食感は、本発明のチーズ  
25 の方が若干ぼろぼろと崩れるような感じであったこと、の他は、ほぼ同  
等であり、本発明のチーズ及びチーズ様食品は、製品の品質についても

、レンネットチーズ製品の品質と同等のものであることが分かった。

#### 図面の簡単な説明

図 1 は、本発明の凝乳酵素の pH 安定性を示す。

5 図 2 は、本発明の凝乳酵素の温度安定性を示す。

図 3 は、本発明の精製凝乳酵素の、10% ポリアクリルアミド電気泳動の結果を示す。

#### 発明を実施するための最良の形態

10 次に、実施例に基づいて本発明を具体的に説明するが、本発明は以下の実施例によって何ら限定されるものではない。

##### 実施例 1

ペニバチルス属細菌の菌株 (F E R M P - 1 8 1 3 8) を、37°C で対数増殖期終期まで培養した培養液 1.2 リットルを、遠心分離にて 15 集菌した。0.5% 可溶性デンプンを含む 5 mM 塩化カルシウム水 600 ml に再懸濁後、一晩培養した。培養後、この培養液を 4°C で遠心分離して粗酵素液とした。この粗酵素液に 50% 飽和となるように硫酸を加え、沈殿を遠心分離で除き、上清に 80% 飽和となるように硫酸を追加した。沈殿を遠心分離で回収し、3.3 mM MES / 3.3 mM 20 HEPES / 3.3 mM 酢酸ナトリウム - 5 mM 塩化カルシウム (pH 5.5) に対して一夜透析した。その結果、BSA 換算で約 2.4 mg の酵素標品を得、この凝乳活性は約 1,100,000 ユニットであった。

##### 25 実施例 2

上記実施例 1 で得た酵素標品を 5 mM 塩化カルシウムを含む 3.3 m

M MES／3. 3 mM HEPES／3. 3 mM 酢酸ナトリウム（pH 5. 5）緩衝液（A 緩衝液）で平衡化したPoros HS 20 ミクロンカラム（直径4. 6 mm x 高さ100 mm）に負荷し、0～0. 2 M 食塩を含むA 緩衝液でリニアーグラジェント溶出を行って活性画分を回収した。この活性画分に1 M となるように硫安を加え、1 M 硫安及び5 mM 塩化カルシウムを含む15 mM トリス・ヒドロキシメチルアミノメタン／15 mM ピーストリス・プロパン（pH 7. 5）緩衝液（B 緩衝液）で平衡化したPoros HP 2 20 ミクロンカラム（直径4. 6 mm x 高さ100 mm）に負荷し、1 M～200 mM 硫安を含むB 緩衝液でリニアーグラジェント溶出を行って活性画分を回収した。この活性画分を5 mM 塩化カルシウムを含む5 mM トリス・ヒドロキシメチルアミノメタン／5 mM ピーストリス・プロパン（pH 7. 0）緩衝液に対して透析し、BSA 換算で約250  $\mu$ g の精製酵素標品を得た。本酵素は、この二段階のカラムクロマトグラフィーによって1. 31倍まで精製され、収率は13. 6 % であった。

### 実施例 3

#### （1）チーズの製造

ペニバチルス属細菌を塗抹し、37°Cにて増殖させた9 cm径シャーレ100枚の寒天から水にて凝乳酵素を抽出し、遠心分離によって菌体及び寒天片を除去した。ろ過後、0. 5% (w/v) となるようにスキムミルクを懸濁して凍結乾燥を行い、凝乳酵素標品とした。牛乳を65°Cで30分間加熱殺菌し、30°Cに冷却後、乳酸菌スターー1%を接種し、本凝乳酵素標品を少量の水に溶解後、添加した。以後、定法により、カッティング、ホエーオフ、圧搾、加塩を行い、6ヶ月熟成させてゴーダチーズを製造した。

## (2) 結果

上記製造法において、レンネットとして、本発明の凝乳酵素を用いた場合（本発明例）、及び子牛レンネットを用いた場合（対照例）について、得られたチーズの遊離アミノ酸を表1に示す。また、レオメーターでピアノ線を用いた場合の本発明例と対照例のせん断応力は、本発明例が231.8±19.8 g f、対照例が207.8±28.1 g fであった。

表 1

## 遊離アミノ酸含有量(mg/g)

| 遊離アミノ酸 | 対照例   | 本発明例  |
|--------|-------|-------|
| Asp    | 0.20  | 0.19  |
| Thr    | 0.45  | 0.34  |
| Ser    | 0.33  | 0.31  |
| Asn    | 0.52  | 0.83  |
| Glu    | 2.06  | 2.39  |
| Gln    | 0.06  | 0.07  |
| Gly    | 0.17  | 0.25  |
| Ala    | 0.23  | 0.21  |
| Val    | 0.53  | 0.78  |
| Met    | 0.33  | 0.21  |
| Ile    | 0.7   | 0.37  |
| Leu    | 1.49  | 1.78  |
| Tyr    | 0.44  | 0.49  |
| Phe    | 0.82  | 0.86  |
| Trp    | 0.19  | nd    |
| Lys    | 0.89  | 0.98  |
| His    | 0.27  | 0.21  |
| Arg    | 0.28  | 0.13  |
| Pro    | 0.21  | 0.32  |
| 合計     | 10.17 | 10.72 |

## 実施例 4

## (チーズの製造)

ペニバチルス属細菌を1%スキムミルク加標準寒天培地100枚に塗付し、35℃で一晩培養後、室温で一日培養した。1.6リットルの水15で寒天から酵素を抽出し、遠心分離で菌体及び寒天片を除き、ろ過後1

3 リットルについて 0.5 % (w/v) となるようにスキムミルクを添加後凍結乾燥した。生乳約 10 リットルを 65 ℃で 30 分間加熱殺菌後、30 ℃に急冷し、凍結乾燥後の酵素抽出液全量と、乳酸菌スターク 5 レンネットを定法に従って添加した。対象として、市販カーフ・レンネットを用いた。そのまま 1 時間保温後、生成したカードをカットし、30 分間攪拌した。カードをガーゼに取ってホエーを抜き、プレス後、20 % 塩水浸漬、乾燥後、真空包装し、15 ℃の熟成庫に保存した。

その際のチーズ重量は、本発明の凝乳酵素を用いたものは 1333. 10 3 g、カーフ・レンネットを用いたものは 1226. 1 g であった。また、食感は、本発明の凝乳酵素を用いたチーズの方が若干ぼろぼろと崩れるような感じであった。電子顕微鏡でチーズ断面の様子を観察したところ、見かけ上大きな差異は認められなかった。

6 ヶ月熟成したチーズについて、遊離アミノ酸組成を比較した。その 15 結果、うまみアミノ酸であるグルタミン酸含量は、本発明の凝乳酵素を用いたチーズの方が若干多い傾向があった。疎水性アミノ酸（バリン、ロイシン、イソロイシン）に関しては、本発明の凝乳酵素を用いたチーズの方が 2 倍近くイソロイシンを含有していたものの、これらの 3 つのアミノ酸含量の合計はほぼ同じであった。

20

### 産業上の利用可能性

以上詳述したように、本発明は、細菌由来凝乳酵素及び当該酵素を用いたチーズの製造に係るものであり、本発明により、以下のような効果が奏される。

25 (1) 新しい凝乳酵素を提供することができる。  
(2) 本発明の凝乳酵素は、キモシン代替酵素として、チーズ及びチー

ズ様食品の製造に用いることができる。

(3) 上記凝乳酵素を用いた新しいチーズ及びチーズ様食品の製造方法を提供することができる。

(4) 上記方法により、レンネットチーズと同等の品質を有するチーズ  
5 及びチーズ様食品を提供することができる。

微生物の寄託についての言及

寄託機関の名称：独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センタ

一

10 あて名：〒305-8566 日本国茨城県つくば市東1-1  
-1 中央第6

寄託した日付：2000年12月8日

受託番号：F E R M P-18138

微生物の表示：P a e n i

## 請求の範囲

1. ペニバチルス属細菌 (P a e n i b a c i l l u s s p .) により生産される、凝乳活性を有する酵素であって、以下の酵素学  
5 的性質；

(1) 作用：乳を凝固させてカードを形成する凝乳作用を有する、(2)  
基質特異性： $\kappa$ カゼインを基質としてカルシウム存在下で Th r 9 4  
- M e t 9 5 を特異的に切断する、(3) 至適 pH : 6. 0 ~ 7. 0、(4)  
分子量：S D S - P A G E により測定した分子量は 3 5, 0 0 0 ~  
10 3 7, 0 0 0 D a 、  
を有することを特徴とする凝乳酵素。

2. 5 0 ~ 8 0 % 飽和の硫酸アンモニウム溶液で塩析される、  
請求項 1 に記載の酵素。

15 3. 5 0 ~ 8 0 % 飽和の硫酸アンモニウム溶液で塩析される、  
安定な pH 領域が 6. 0 ~ 8. 0 、安定な温度域が 4 0 ~ 5 0 ℃ である  
ことを特徴とする請求項 2 に記載の酵素。

20 4. ペニバチルス属細菌が、受託番号 F E R M P - 1 8 1 3  
8 である、請求項 1 に記載の酵素。

5. 乳を原料としてチーズを製造するに当たり、請求項 1 から  
4 のいずれかに記載の凝乳酵素を用いてカードを形成させ、ホエー分離  
25 後、熟成させることを特徴とするチーズの製造方法。

6. 請求項5に記載の方法により製造される、乳を原料として細菌由来凝乳酵素を用いて製造したことを特徴とするチーズ様食品。

1 / 3

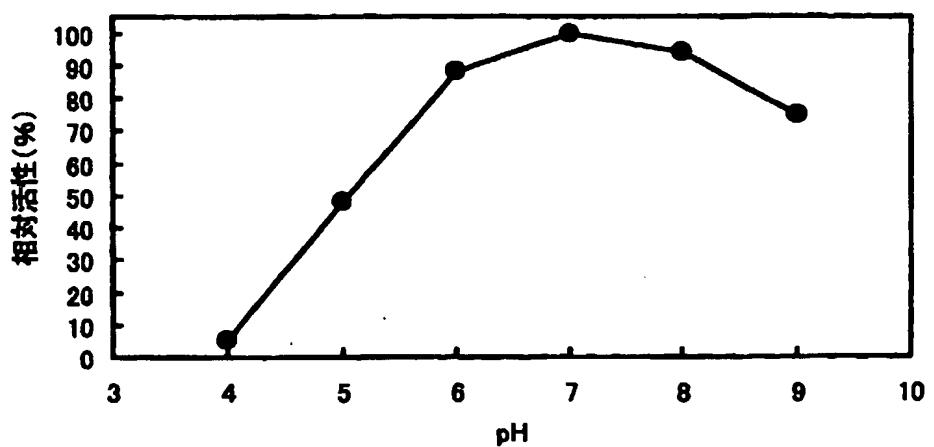


図 1

2 / 3

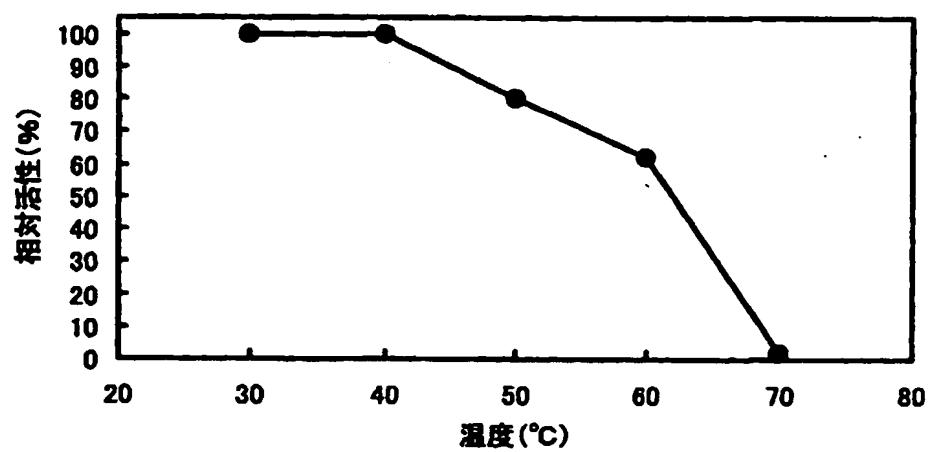


図 2

3 / 3

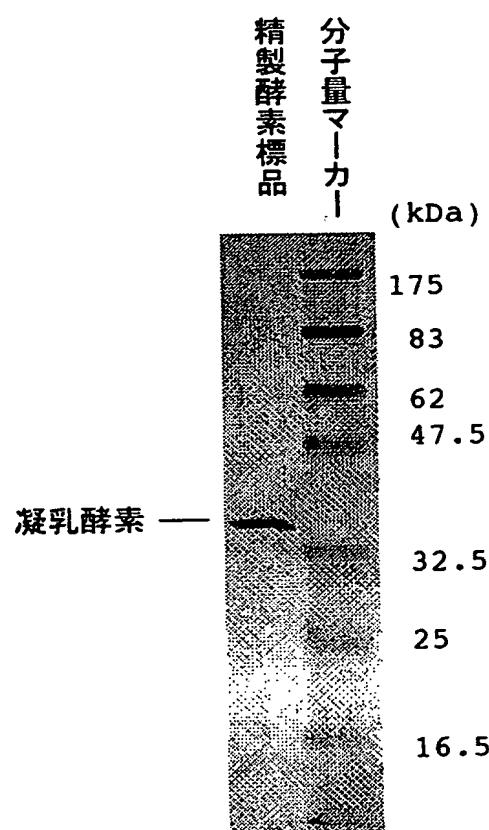


図 3

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/08373

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
Int.Cl<sup>7</sup> C12N9/52, A23C19/032

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
Int.Cl<sup>7</sup> C12N9/52, A23C19/032

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
BIOSIS/WPI (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| A         | WO 00/73429 A1 (Amano Enzyme Inc.),<br>13 February, 2000 (13.02.00),<br>& EP 1186658 A1 & JP 2001-37474 A  | 1-6                   |
| P, X      | WO 02/82916 A1 (Mahoroba Co., Ltd.),<br>24 October, 2002 (24.10.02),<br>& JP 2002-306063 A   | 1-6                   |
| P, X      | Daisuke YASOGAWA et al., "Paenibaciluls-zoku<br>Saikin no Seisan suru Gyonyu Koso", Japan Society<br>for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry<br>Taikai Yoshishu, 2003, page 34, 2A10p07 | 1-6                   |

 Further documents are listed in the continuation of Box C.  See patent family annex.

|   |  |
|---|--|
| • Special categories of cited documents:<br>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>"E" earlier document but published on or after the international filing date<br>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)<br>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention<br>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone<br>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art<br>"&" document member of the same patent family |
|---|--|

|   |   |
|---|---|
| Date of the actual completion of the international search<br>27 August, 2003 (27.08.03) | Date of mailing of the international search report<br>09 September, 2003 (09.09.03) |
|---|---|

|  |                    |
|--|--------------------|
| Name and mailing address of the ISA/<br>Japanese Patent Office | Authorized officer |
| Facsimile No.  | Telephone No.      |

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))  
Int. C17 C12N9/52, A23C19/032

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))  
Int. C17 C12N9/52, A23C19/032

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)  
BIOSIS/WPI (DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の<br>カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示  | 関連する<br>請求の範囲の番号 |
|-----------------|--|------------------|
| A               | WO 00/73429 A1(天野エンザイム株式会社)2000.02.13 &<br>EP 1186658 A1 & JP 2001-37474 A     | 1-6              |
| P X             | WO 02/82916 A1(株式会社まほろば)2002.10.24 &<br>JP 2002-306063 A                       | 1-6              |
| P X             | 八十川 大輔 他, <i>Paenibacillus</i> 属細菌の生産する凝乳酵素, 日本農芸化学会大会要旨集 2003, p. 34, 2A10p07 | 1-6              |

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

|   |   |
|---|---|
| 国際調査を完了した日<br>27.08.03  | 国際調査報告の発送日<br>09.09.03                                      |
| 国際調査機関の名称及びあて先<br>日本国特許庁 (ISA/JP)<br>郵便番号 100-8915<br>東京都千代田区霞が関三丁目4番3号 | 特許庁審査官 (権限のある職員)<br>本間 夏子<br>印<br>電話番号 03-3581-1101 内線 3488 |